

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización probiótica de una cepa nativa de
Enterococcus faecium QPa.1 Aislada de queso de
elaboración artesanal**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Liz Erika Cruz Pio

ASESOR

M.Sc. Elena Luzgarda Quillama Polo

Lima – Perú

2011

A Dios, por su protección divina, por llevarme siempre
por el camino del bien y por darme las fuerzas
para seguir adelante ante la adversidad.

A mis queridos padres Florencia Pio Chávez y Lloni
Cruz Hidalgo, por su apoyo y comprensión
en la realización de la presente tesis.

A mi estimada profesora Elena L. Quillama Polo, por
sus enseñanzas, formación humana de calidad, por
sus acertadas orientaciones y su amistad sincera.

AGRADECIMIENTOS

- A M.Sc. Elena L. Quillama Polo, mi profundo agradecimiento por su asesoramiento en la presente tesis y por su labor en mi formación científica y humanística.
- A los miembros del jurado Dr. Abad Flores Paucarima, Mg. Domingo Iparraguirre León y Mg. Jorge León Quispe, por sus correcciones y recomendaciones realizadas en el presente trabajo.
- A mis amigas y colegas Yuriana Huamán, Ginger Gandolfo, por su apoyo incondicional, por todos los buenos momentos compartidos, por su apoyo solidario en todos los momentos en que necesité respaldo, pero sobre todo por brindarme una amistad sincera.
- A mis hermanos Franz, Vanessa y Andrea, por su apoyo, comprensión y compañía.
- A mis profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas, que siempre entregaron lo mejor de sí, en cada una de sus clases.

ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
FAO	Food and Agriculture Organization
GRAS	Generally recognized as safe
CIPROLAC	Cultivos iniciadores y probióticos lácticos
mm	Milímetros
gr.	Gramos
µg	Microgramos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
N	Normalidad
M	Molaridad
D.O	Densidad óptica
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	Acido cloridrico
MRS	Man rogosa sharpe
BHI	Brain heart infution
YPG	Yeast peptone glucose
PBS	Buffer fosfato salino
SAT	Salt aggregation test

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
III.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	13
III.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
III.3 METODOLOGÍA.....	14
III.3.1 Activación de las cepas de bacterias lácticas.....	14
III.3.2 Prueba de resistencia a antibióticos.....	14
III.3.3 Determinación de la actividad hemolítica.....	15
III.3.4 Actividad inhibitoria de la bacteriocina producida por <i>Enterococcus faecium</i> QPa.1 contra bacterias patógenas de alimentos.....	15
III.3.5 Tolerancia a bilis.....	16
III.3.6 Tolerancia a valores bajos de pH.....	16
III.3.7 Actividad Proteolítica.....	17
III.3.8 Prueba de agregación en sales.....	17
III.3.9 Prueba de aglutinación.....	17
III.3.9.1 Producción de sustancias tipo lectina.....	18
III.3.9.2 Prueba de la inhibición de la aglutinación.....	18
IV. RESULTADOS.....	19
V. DISCUSIÓN.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	31
VII. RECOMENDACIONES.....	32
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
IX. ANEXOS.....	39

RESUMEN

Los Enterococos constituyen parte de la microflora autóctona de leches crudas, quesos artesanales y otras fuentes, y contribuyen con las características organolépticas de estos productos. Algunas cepas sintetizan diversos metabolitos de interés biotecnológico y son utilizadas como cultivos iniciadores y/o probióticos.

Los probióticos son organismos vivos que al ser ingeridos benefician al huésped mejorando su balance intestinal. Los efectos benéficos en la salud incluyen tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales, mantenimiento y equilibrio de la función intestinal, mejoramiento de la respuesta inmune, aumento del valor nutritivo de los alimentos, tolerancia a la lactosa, reducción de los niveles lipídicos y suministro de oligoelementos, entre otros.

En el presente trabajo se evaluó parcialmente las propiedades probióticas de *Enterococcus faecium* QPa.1, aislada por primera vez de quesos de elaboración artesanal. Para este propósito se realizaron varias pruebas, y se pudo comprobar una gran sensibilidad a la mayoría de los antibióticos ensayados, ausencia de actividad hemolítica, actividad antimicrobiana específica frente a *Listeria monocytogenes*, tolerancia a diferentes concentraciones de sales biliares (0,3 a 2% de bilis de buey) y resistencia a pH 2 y 3. Asimismo reveló una buena actividad proteolítica y propiedades de adherencia.

Enterococcus faecium QPa.1 presenta características propias de un probiótico y tiene una buena actividad inhibitoria solo contra *Listeria monocytogenes*, bacteria de alto riesgo patológico para la salud humana. Por lo tanto, esta cepa seleccionada puede ser útil como probiótico o como cultivo adjunto y/o bioprotector para la elaboración de quesos regionales, preservando su valor, calidad nutritiva y seguridad sanitaria.

Palabras claves: *Enterococcus faecium* QPa.1, probióticos, quesos

ABSTRACT

Enterococci are part of the indigenous microflora of raw milk, traditional cheeses and other sources and contribute to the organoleptic characteristics of these products. Some strains synthesize various metabolites of biotechnological interest and are used as starter cultures or probiotics.

Probiotics are live organisms, which upon ingestion benefit the host by improving its intestinal balance. The beneficial effects on health include prevention and treatment of gastrointestinal diseases, maintenance and balance of intestinal function, improved immune response, increased nutritional value of food, lactose tolerance, reduction of cholesterol levels and supply of trace elements, among others.

The present work evaluated partially probiotic properties of *Enterococcus faecium* QPa.1, to first time was isolated traditional cheeses. For this purpose several tests were performed, it was found very sensitivity to most antibiotics tested, no haemolytic activity, specific antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*, tolerance to different concentrations of bile salts (0,3 - 2 % oxgall) and resistance to pH 2 and 3. Also demonstrated good proteolytic activity and adherence properties.

Enterococcus faecium QPa.1 presents probiotic characteristics and has a good inhibitory activity only against *Listeria monocytogenes*, bacteria of pathological risk to human health. Therefore, the selected strain may be useful as a probiotic culture or as adjunct and/or bioprotective cultures in cheeses traditional making, to preserving value, nutritional quality and health safety.

Key words: *Enterococcus faecium* QPa.1, probiotics, chesses.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), el queso es un producto fresco o maduro obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche. Para la obtención, se cuaja primero con renina (enzima extraída del cuarto estómago de los rumiantes lactantes), se comprime y exprime después de eliminar el suero y por último se le añade sal para su conservación. Existen 2 tipos de fabricación del queso: artesanal e industrial.

La fabricación artesanal, incluye cultivos nativos conformados por ciertas cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, mientras que la fabricación industrial utiliza cultivos iniciadores lácticos seleccionados.

Las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado entre los microorganismos empleados con fines probióticos. Dentro de las bacterias lácticas, los dos géneros más empleados hasta la fecha con ese fin son *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Hotzapfel *et al.*, 1998). Diversas cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* se han empleado y se siguen empleando como probióticos humanos en diferentes presentaciones. Además, algunos estudios han puesto en evidencia la presencia de enterococos en alimentos y suplementos probióticos (Temmerman *et al.*, 2003)

Por otra parte, estas bacterias también se han aplicado como probióticos en animales. En 2004, la Unión Europea autorizó el uso de 10 preparaciones como aditivos en piensos animales que contienen 9 cepas de *E. faecium* (Comisión Europea, 2004).

La importancia de este estudio radica en la selección de nuevas cepas lácticas a partir de quesos artesanales de origen peruano, con propiedades probióticas, y la posibilidad de ser utilizadas para la producción de alimentos funcionales en base a diversos substratos de nuestro país. Para este propósito, es necesario confrontar el principio activo purificado de las cepas lácticas nativas a ensayar, frente a bacterias patógenas contaminantes de alimentos que afecten la salud humana y comprobar la sensibilidad a los antimicrobianos, su resistencia a la acidez gástrica, a los ácidos biliares y capacidad de adherencia a las líneas celulares humanas.

La introducción de especies bacterianas beneficios debidamente caracterizadas, dentro del tracto gastrointestinal es una opción atractiva para restablecer el equilibrio microbiano y prevenir la enfermedad por medios dietéticos, esto se puede conseguir utilizando alimentos alternativos funcionales (Marteu *et al.*, 2001).

La biotransformación de diversos substratos naturales con bacterias lácticas probióticas evaluadas adecuadamente, puede mejorar las propiedades de éste, debido al efecto protector ocasionado por el desarrollo y metabolismo de las bacterias probióticas, resultando en un producto nuevo con un valor agregado mayor a los originales sin biodegradar. Nuestro interés en este contexto fue caracterizar las propiedades probióticas de una cepa nativa preseleccionada de *Enterococcus faecium* QPa.1 asociada a quesos artesanales, con el fin de diseñar cultivos iniciadores y cultivos probióticos para la producción de quesos originales de óptima calidad para el consumo.

II. MARCO TEÓRICO

Las bacterias lácticas conformadas por los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*; se caracterizan por ser bacilos o cocos Gram positivos, no formadores de esporas, no móviles, catalasa negativo, crecen óptimamente a 30°C en condiciones de microaerofilia y son exigentes en sus requerimientos nutricionales. Dependiendo de la ruta de fermentación de las hexosas las bacterias lácticas están divididas en dos grupos fisiológicos: homofermentativos y heterofermentativos. Los homofermentativos degradan las hexosas vía glicólisis produciendo ácido láctico como producto principal, mientras que las heterofermentativas utilizan la vía de la pentosas fosfato para dar ácido láctico, acético, CO₂ y/o etanol. (Sneath *et al.*, 1986; Zúñiga *et al.*, 1993).

Las bacterias lácticas producen numerosos compuestos como ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, que contribuyen con el aroma, sabor, textura de un determinado alimento fermentado. Otros metabolitos como el etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo y reuterina, contribuyen también a la preservación potencial de estos alimentos. Asimismo pueden sintetizar sustancias inhibitorias de naturaleza proteica como la bacteriocina (Hugas *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998).

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica, capaces de inhibir el crecimiento de otros individuos de la misma familia. Para su estudio Nes *et al.*, 1996 clasificaron a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas, y los dividió en dos grupos:

(1) Las bacteriocinas de clase I o lantibióticos, péptidos pequeños, activos sobre la membrana que contiene algunos aminoácidos poco comunes, como lantionina, b - metil - lantionina y dihidroalanina. Los lantibióticos se dividen a su vez en lantionina A

y B, de acuerdo a sus características estructurales: los del grupo A son moléculas alargadas con estructura flexible en solución y el grupo B adopta una estructura más rígida.

(2) Las bacteriocinas de clase II o no lantibióticos, son sustancias de peso molecular variable que contiene aminoácidos comunes y que se pueden diferenciar en cuatro grupos. Las clases IIa son péptidos activos frente a *Listeria*; las de clase IIb son formadoras de porinas, constituidas por dos péptidos necesarios para actividad antimicrobiana; las de clase IIc son péptidos pequeños, termoestables, y necesitan un transportador; y las de clase IId definidas como bacteriocinas circulares.

Se ha sugerido una tercera clase de bacteriocinas en las que se incluyen enzimas termolábiles que degradan la pared celular; sin embargo, este grupo aun está en discusión (López - Brea & Domingo, 2007).

En la actualidad, las principales bacterias lácticas relacionadas con los alimentos y que poseen interés industrial pertenecen al género *Enterococcus* y se caracterizan por ser cocos ovoides, Gram-positivos, con un bajo contenido de G+C (<50 mol%) en su DNA y que se disponen solos, en parejas o formando cadenas cortas. En general, son organismos anaerobios aerotolerantes ya que, aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasas y peroxidasas que degradan el oxígeno y el peróxido de hidrógeno generados en condiciones de aerobiosis. El metabolismo de carbohidratos de los enterococos es típicamente homofermentativo (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas) y conduce a la producción de ácido L- láctico como producto final predominante (Scheifer & Kilpper-Bälz, 1987).

Enterococcus spp., crecen a una temperatura óptima de 35 °C, sin embargo la mayoría de las especies pueden crecer entre 10 y 45 °C. También son capaces de sobrevivir en condiciones adversas, crecen bien en cloruro de sodio al 6,5%, pH 9,6,

temperatura de 60 °C durante 30 minutos. Gran parte de las especies de *Enterococos* pueden hidrolizar a la esculina y en presencia de 40% de sales biliares (Foulquié *et al*, 2006; Ogier & Serror, 2007).

Los *Enterococcus* se encuentran en numerosos alimentos tradicionales fermentados y representan una parte importante de la microbiota de una gran variedad de quesos elaborados en diversos países, a partir de leche cruda o pasteurizada (Centeno *et al.*, 1996). Algunas cepas son útiles como probióticos por sus beneficios terapéuticos y nutricionales (Fleet, 1999).

El término “probiótico” deriva de dos vocablos, del latín “pro” que significa por o a favor de, y del griego “bios” que quiere decir vida; literalmente el término probiótico significa “a favor de la vida”. Si bien desde los años `60 han surgido varias nuevas definiciones de esta palabra, su origen se remonta a principios del siglo XX (Stanton *et al.*, 2003). Eli Metchnikoff, científico ruso que fue galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur, fue uno de los primeros en hablar del rol positivo que podían ejercer algunas bacterias lácticas en la salud del ser humano. En su libro *The Prolongation of Life*, en 1907, sugirió que debido a la dependencia que existe entre la flora intestinal y los alimentos, existía la posibilidad de modificar la flora de nuestro organismo reemplazando microorganismos patógenos por beneficiosos (Leahy *et al.*, 2005). Paralelamente, Henry Tissier, pediatra francés, sugirió la posibilidad de administrar bifidobacterias a niños con diarreas para el restablecimiento de una microbiota intestinal saludable, ya que las mismas constitúan la microbiota predominante en niños sanos alimentados con leche materna y se veían disminuidas en niños con diarrea (Stanton *et al*, 2003).

Desde su nacimiento, el término probiótico ha tenido diferentes acepciones. En primer lugar, fue usado por Lilly & Stillwell en 1965, para describir a las sustancias producidas por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros microorganismos (Leahy *et al.*, 2005).

En 1974, Parker denominó probióticos a aquellos organismos o sustancias que tienen efecto benéfico sobre la microbiota intestinal de animales (Havenaar & Huis in't Veld, 1992; Leahy *et al.*, 2005). Luego, Fuller (1989), destacó el carácter microbiano de los probióticos, definiéndolos como un suplemento dietético a base de microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio intestinal. Havenaar & Huis in't Veld, en 1992, ampliaron la definición, estableciendo nuevos criterios, por ejemplo: que los probióticos pueden ser destinados al consumo humano o animal, y sus efectos no se limitan al tracto gastrointestinal, sino que también pueden impactar el tracto urogenital, etc., y que pueden consistir de un monocultivo o de un cultivo mixto.

En 1995, los científicos participantes de una reunión sobre probióticos, desarrollada en Frankfurt, Alemania, adoptaron la siguiente definición de probióticos: "microorganismos vivos que ejercen beneficios en la salud más allá de la nutrición básica, luego de una ingesta adecuada" (Guarner & Schaafsma, 1998). Posteriormente, en 1999, Naidu y colaboradores definieron a los probióticos como adyuvantes dietarios microbianos que afectan beneficiosamente al huésped, modulando la inmunidad sistémica y de la mucosa, así como también mejorando el balance microbiano y nutricional en el tracto gastrointestinal (Sanders, 2000). En el mismo año, surgió otra definición en la que se incluyen como probióticos tanto células microbianas viables, como microorganismos inactivos o componentes celulares microbianos, disminuyendo la importancia dada en las otras definiciones a la viabilidad microbiana (Lee *et al.*, 1999; Salminen *et al.*, 1999). En 2001, Schrezenmeir & Vrese

definieron el término probiótico como un producto o una preparación conteniendo suficiente número de microorganismos viables bien definidos, que altera la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped, ejerciendo de este modo un efecto benéfico (Schrezenmeir & Vrese, 2001). Finalmente, también en el mismo año, una consulta de expertos de FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, adoptaron la siguiente definición de probióticos: “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (FAO/OMS, 2001).

En esta definición, la cual constituye actualmente una de las más aceptadas, se reconocen las siguientes características de los probióticos (Sanders, 2000):

- Los probióticos deben estar vivos.
- Los probióticos deben ejercer un beneficio fisiológico que pueda ser medido por estudios adecuados realizados en el huésped.
- Los probióticos no son exclusivamente incorporados en alimentos o ingeridos por vía oral. Otras formas de incorporación en el organismo son posibles, como preparaciones farmacéuticas o agentes tópicos.
- El mecanismo de acción de los probióticos no está limitado al mejoramiento del equilibrio microbiano intestinal, sino que existe un amplio espectro de efectos benéficos en el huésped.

Como puede observarse, el concepto de probiótico ha cambiado con los años y aún no existe consenso entre los especialistas sobre una única definición. Seguramente, seguirán apareciendo nuevas definiciones de acuerdo a los hallazgos científicos y a las opiniones de los expertos en el tema (Ziemer & Gibson, 1998; Ouwehand *et al.*, 2002). A pesar de que actualmente se reconocen ciertos efectos positivos de distintos componentes celulares en el huésped, la mayoría de las

definiciones mencionan la viabilidad de los microorganismos como requisito primordial para definir un probiótico (Sanders, 2000). En las últimas décadas, el interés por un mayor conocimiento de los efectos terapéuticos beneficiosos de nuevas cepas con propiedades probióticas ha crecido a nivel global.

En general los probióticos actúan acidificando el ambiente intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen la flora intestinal y así evitan la acción de patógenos. Además, tiene propiedades inmunomoduladoras, ya que modifican la respuesta a antígenos, aumentando la secreción de IgA específica frente a rotavirus, facilitan la captación de antígenos en la placa de Peyer, producen enzimas hidrolíticas, y disminuyen la inflamación intestinal. Mediante la supresión del crecimiento de bacterias que convierten los procarcinógenos en carcinógenos, el consumo de enzimas procarcinógenas o a través de la producción de sustancias inhibitoras de dichas enzimas es posible que disminuyan el desarrollo de determinados tumores. También aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tiene un efecto hipocolesterolémico. Mediante la producción de triglicéridos de cadena corta inhiben la síntesis de colesterol, lo redistribuyen desde el plasma al hígado y por desconjugación de las sales biliares el colesterol no se reabsorbe (Ferrer & Dalmau, 2001).

El principal mecanismo de acción de los probióticos es la exclusión competitiva, pero se ha sugerido, muchas otras acciones benéficas. La capacidad de la flora intestinal para evitar la colonización de otras bacterias potencialmente patógenas ha sido atribuida a diferentes mecanismos relacionados con la competencia por nutrientes, por los espacios y puntos de adhesión en el epitelio intestinal y también por

la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) o productos metabólicos que inhiben su crecimiento (Medel y *col.*, 2007).

Existen diversos criterios para la selección de bacterias para ser utilizadas como microorganismos probióticos. En primer lugar, hay que destacar que el criterio fundamental para la elección de una cepa probiótica es que la misma ejerza una acción benéfica en el huésped, determinada fehacientemente en estudios clínicos adecuados. Este tipo de criterio de selección se denomina específico o funcional, y se valora al momento de considerar el propósito de uso del probiótico (Havenaar & Huis in't Veld, 1992; Sanders & Huis in't Veld, 1999).

Más allá de los criterios específicos, es importante recalcar que la cepa solamente puede ser usada y ejercer efectivamente su acción probiótica en el huésped si cumple una amplia serie de otros criterios generales, relacionados con aspectos de bioseguridad, tecnológicos y biológicos (Havenaar & Huis in't Veld, 1992; Holzapfel & Schillinger, 2002; Ouwehand *et al.*, 2002; Stanton *et al.*, 2003). Por más que una cepa bacteriana tenga varias propiedades funcionales, si no cumple un mínimo de estos requisitos generales, existen muy escasas posibilidades de incorporarla en la dieta humana como bacteria probiótica.

Las cepas seleccionadas para su potencial uso como probióticos deben ser cepas seguras, es decir tener el status GRAS (Generally Recognized as Safe), los componentes celulares y los productos de fermentación de los mismos no deben generar reacciones carcinogénicas, mutagénicas, alérgicas, tóxicas o patogénicas. Se requiere que presenten estabilidad genética para el mantenimiento de sus propiedades benéficas (Havenaar & Huis in't Veld, 1992; Stanton *et al.*, 2003), y que no posean genes de resistencia a antibióticos que podrían ser transferidos a otros microorganismos patógenos (Gibson & Fuller, 2000; Borriello *et al.*, 2003).

Por otro lado, las bacterias deben ser de origen intestinal humano, para aumentar las posibilidades de supervivencia y efectos beneficiosos en el hombre, dado por interacciones especie - específicas con el huésped (Gilliland, 1998; Gibson & Fuller, 2000; Ouwehand *et al.*, 2002). Sin embargo, el consenso sobre este criterio no es total, ya que algunos científicos sostienen que es más importante la especificidad de acción que la fuente del microorganismo, la cual es muy difícil de ser confirmada (FAO/OMS, 2001).

Las bacterias probióticas deben encontrarse en altas concentraciones en los productos a los cuales fueron adicionadas, hasta el momento de su uso o consumo. Para ello se deben considerar ciertas características, como la posibilidad de propagación económica y la resistencia a los procesos de obtención de cultivos concentrados. También deben mantener su viabilidad y características probióticas a lo largo del proceso industrial de elaboración y almacenamiento del producto en el que son introducidas, durante el cual pueden darse distintas condiciones de estrés para los microorganismos. Por ejemplo, los probióticos incorporados en un alimento se ven expuestos a condiciones que pueden resultar hostiles y afectar su supervivencia, como bajos valores de pH, cambios de temperatura y contenido de oxígeno, actividad acuosa relativamente baja, interacciones con los cultivos iniciadores y otros microorganismos presentes, y la presencia de bacteriófagos y de aditivos alimentarios (Haberer *et al.*, 1996; Charteris *et al.*, 1998; Vinderola, 2002).

Según la vía de administración, los probióticos se encuentran con distintas barreras biológicas dispuestas naturalmente para la protección frente a la entrada de microorganismos patógenos al cuerpo humano. Los probióticos no deben ser eliminados por estos mecanismos de defensa del organismo para poder alcanzar el sitio de su acción benéfica en altas concentraciones. De este modo, los

microorganismos utilizados por vía oral, deben ser resistentes frente a las condiciones adversas presentes en el tracto gastrointestinal: enzimas de la cavidad oral (por ej.: lisozima y amilasa), gástricas (pepsina y lipasa), pancreáticas e intestinales, el bajo pH del estómago dado por la alta concentración de ácido clorhídrico y la presencia de ácidos biliares (Havenaar & Huis in't Veld, 1992; Charteris *et al.*, 1998). Hay que tener en cuenta que el alimento que se utiliza como vehículo de las bacterias puede afectar su tolerancia frente a estas barreras biológicas (FAO/OMS, 2001; Vizoso Pinto *et al.*, 2006).

Por otro lado, la capacidad de adherencia a las células epiteliales intestinales (considerada huésped-específica) y al mucus intestinal es considerada una característica muy importante para aumentar la supervivencia y favorecer la colonización del probiótico en el intestino (Charteris *et al.*, 1998).

Maragkoudakis *et al.*, (2006) evaluaron 29 cepas de *Lactobacillus* de origen lácteo y comprobaron que todas las cepas sobrevivían a pH 3,0, en presencia de pancreatina y sales biliares, además ninguna fue hemolítica y la mayoría de las cepas fueron resistentes a la vancomicina, además comprobaron que *L. casei* Shirota ACA-DC 6002, *L. plantarum* ACA-DC 146 y *L. paracasei subsp. tolerans* ACA-DC 4037 tuvieron la capacidad de inhibir la adhesión de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* a las células Caco-2.

El-Naggar (2004) en Egipto, evaluando un consorcio de bacterias lácticas comerciales, conformadas por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis*, demostró que las 4 cepas productoras de sustancias antimicrobianas inhibían a *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* y tenían una buena coagregación, el porcentaje de supervivencia más alto en condiciones acídicas ocurrió solo con *L. acidophilus* y *B. subtilis*.

Kacem & Karam (2006) en Argelia, evaluaron algunas características probióticas de 11 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de aceitunas fermentadas y comprobaron que fueron susceptibles a la mayoría de antibióticos utilizados en terapia clínica humana, además fueron tolerantes a concentraciones altas de bilis 2% y resistentes a pH 2,0 y ninguna de la cepas produjeron exopolisacáridos y hemolisinas.

En Eslovaquia, Marciňáková *et al.*, (2004), evaluaron las propiedades probióticas de *Enterococcus faecium* EF9296 aislado de ensilaje (alimento forrajero preservado) y demostraron que esta cepa, era sensible a ampicilina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina y vancomicina, pero resistente a kanamicina, tolerante a bilis y tenía buena capacidad adhesiva a mucus humano y canino. Además comprobaron, que producía una bacteriocina con actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas incluyendo *Enterococcus* y *Listeria monocytogenes*.

En Argentina, Draksler *et al.*, (2004), seleccionaron 5 cepas de bacterias lácticas con características probióticas a partir de 137 cepas aisladas de heces de cabras, 3 cepas fueron identificadas como *Lactobacillus* y 2 como *Enterococcus*. Estas fueron resistentes a pH 2,0 y a sales biliares (0,3%). Comprobaron también que tiene una buena capacidad de adhesión mediante pruebas de aglutinación.

En Venezuela, Mejía *et al.*, (2007), lograron identificar 22 cepas como *Lactobacillus* a partir de 360 cepas de microorganismos aislados de niños lactantes y muestras vaginales. Estas fueron resistentes a condiciones hostiles como pH 3,0 y 0,3% de sales biliares, y las sustancias producidas por estas cepas, inhibieron el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, y patógenos gastrointestinales.

En Grecia, Xanthopoulos *et al.*, (2000) aislaron a partir de heces de infantes recién nacidos *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*, capaces de metabolizar la leche, resistentes a los antibióticos, pH y tolerantes a bilis; recomendando la posibilidad de su uso terapéutico como cultivos iniciadores en la producción de leche fermentada.

En Cuba, Brizuela *et al.*, (2001) lograron caracterizar cepas probióticas de *Lactobacillus* LB 12 y B/103-1-5, utilizando pruebas *in vitro*, como la tolerancia a pH 3,0, resistencia a bilis y antimicrobianos.

Coppola *et al.*, (2005) y Belicová *et al.*, (2007) evaluaron la susceptibilidad de antibióticos de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y cepas de Enterococos, aislados de queso Parmigiano Reggiano de Italia y queso Bryndza de Eslovaquia respectivamente. Comprobaron que la mayoría de las cepas fueron susceptibles a inhibidores de pared celular, beta lactámicos, considerados como activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Asimismo observaron una sensibilidad en todas las cepas de *L. rhamnosus* aisladas frente a los inhibidores de síntesis de proteínas y macrólidos. Los enterococos fueron sensibles a la vancomicina, mientras que algunas cepas de *L. rhamnosus* mostraron una susceptibilidad variable frente a las cefalosporinas y fueron resistentes a los aminoglucósidos, vancomicina, lincomicina.

En Italia, Lavermicocca *et al.*, (2005) demostraron cepas de *Lactobacillus* aisladas de aceitunas tienen características probióticas con capacidad de sobrevivir después de ser consumidas por humanos. Estos resultados sugieren que las aceitunas son sustratos adecuados para llevar bacterias lácticas probióticas al tracto gastrointestinal.

En Irlanda, Gardiner *et al.*, (1999), evaluaron el uso de queso cheddar como vehículo para llevar cepas viables probióticas de *Enterococcus faecium* Fargo 688 al tracto

gastrointestinal. Incorporaron las cepas como cultivo iniciador en la manufactura de queso y yogurt. Asimismo, realizaron pruebas *in vitro*, utilizando como modelo experimental a cerdos. Observaron que el queso Cheddar es un alimento más efectivo para llevar microorganismos probióticos viables al tracto gastrointestinal.

En Perú, Lázaro y col., 2005 evaluaron el uso de aditivos probióticos comerciales de *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus coagulans*, en la alimentación de ganado porcino. Observaron un aumento en el peso, disminución de la morbilidad y mortalidad de lechones.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.

III.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa en estudio: *Enterococcus faecium* QPa.1, productora de sustancia tipo bacteriocina, aislada de queso de la región de Puno, Perú. Procedente de la colección de cultivos iniciadores y probióticos lácticos (CIPROLAC) Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
- Cepas testigo: *Lactobacillus plantarum* E2 y M4 productoras de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocina, aisladas de “chicha de jora” y “masato” respectivamente.
- Cepas lácticas sensibles o indicadoras a sustancias antimicrobianas: *Lactobacillus fermentum* ChJ4C, y *Enterococcus faecium* QPe.1, aisladas de “chicha de jora” y queso respectivamente.
- Bacterias potencialmente patógenas contaminantes de alimentos y posibles indicadores o sensibles: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, procedentes de la colección CIPROLAC.

III.3 METODOLOGÍA

III.3.1 Activación de las cepas de bacterias lácticas

La cepa *Enterococcus faecium* QPa.1, productora de la sustancia antimicrobiana y las cepas de bacterias lácticas patrones y sensibles, fueron reactivadas en Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6,5 e incubadas a 30 °C, en condiciones de microaerofilia.

Las cepas patógenas contaminantes de alimentos también se reactivaron en Caldo Brain Heart Infusion (BHI) pH 7,0 por 3 pasajes sucesivos para verificar su pureza, características microscópicas y actividad antimicrobiana.

III.3.2 Prueba de la resistencia a antibióticos

La cepa *Enterococcus faecium* QPa.1, previamente fue activada en Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6,5 por dos pasajes sucesivos y fue incubada a 30 °C por 24 horas en condiciones de microaerofilia.

Para comprobar la resistencia o sensibilidad de la cepa en estudio a los antibióticos de uso clínico, el cultivo bacteriano con una densidad óptica (D.O) de 0,5 a 560 nm fue sembrado en la superficie con un hisopo estéril por el método de diseminación en placas con Agar Mueller-Hinton pH 7,3.

El antibiograma se realizó mediante el método disco - difusión estandarizado de Kirby - Bauer. Los discos utilizados fueron los siguientes: Ampicilina (10 µg), Bacitracina (10 µg), Cefoxitina (30 µg), Cloramfenicol (30 µg), Eritromicina (15 µg), Estreptomicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Lincomicina (2 µg), Oxacilina (1 µg), Penicilina (10 µg), Rifampicina (30 µg), Tetraciclina (30 µg) y Vancomicina (30 µg). Estos discos se ubicaron con una pinza estéril sobre las placas con Agar inoculadas con *Enterococcus faecium* QPa.1. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 30 °C por 24 horas.

Las lecturas se efectuaron midiendo el diámetro de la zona de inhibición a las 24 horas de crecimiento bacteriano. La cepa fué clasificada como sensible o resistente según los criterios del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) descrita por Xanthopoulos *et al.*, 2000; Kacem & Karam, 2006; Lauková *et al.*, 2008.

III.3.3 Determinación de la actividad hemolítica

La detección de hemólisis del cultivo puro, se realizó mediante el método de estriado en placas con Agar Nutritivo pH 7,0, conteniendo 5 % de sangre de carnero, se incubó a 30 °C en condiciones de microaerofilia. La lectura se efectuó a las 24 horas de crecimiento bacteriano, según Maragkoudakis *et al.*, 2006; Kacem & Karam, 2006.

La actividad hemolítica se determinó observando la aparición o no de zonas de lisis alrededor de la colonia de *Enterococcus faecium* QPa.1.

III.3.4 Actividad inhibitoria de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a bacterias patógenas contaminantes de alimentos

Para comprobar la actividad antagónica de *Enterococcus faecium* QPa.1, el sobrenadante, fue obtenido mediante centrifugación a 4000 rpm por 30 minutos a partir de un cultivo en fase logarítmica tardía, luego se separó en 2 fracciones de 10 ml A: sobrenadante no tratado de la cepa productora (Control), B: sobrenadante filtrado a través de una membrana Millipore 0,22 µm, y neutralizado a pH 6,5, NaOH 4N.

Asimismo se obtuvieron cultivos activos de 12 horas de crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* con una densidad óptica (D.O_{560 nm}) igual a 0,3. La determinación del efecto antimicrobiano se realizó mediante el método de difusión en agar, adicionando 0,1 ml del cultivo a 20 ml de agar BHI pH 7,0 al 1%, luego con la ayuda de un sacabocado se realizaron orificios donde se colocó 150 µl del sobrenadante a ensayar, las placas se dejaron reposar por una hora a temperatura ambiente para que el sobrenadante colocado en los pocillos sea absorbido y luego fueron incubadas a 30 °C, las lecturas se efectuaron después de 18 horas de crecimiento microbiano. Para el control positivo se utilizó *Enterococcus faecium* QPe.1, cepa sensible a la actividad inhibitoria de la cepa en estudio, con una D.O_{560 nm} de 0,5.

La actividad inhibitoria se evidenció por la aparición de halos de inhibición en el crecimiento, según Tagg & Macgiver, 1981; Quillama 1998; Gusils *et al.*, 2002a; Draksler *et al.*, 2004; El- Naggar 2004; Sedano 2006.

III.3.5 Tolerancia a bilis:

El cultivo activo de *Enterococcus faecium* QPa.1 con 12 horas de crecimiento, fue medido a una D.O a 560 nm de 0,1, luego se adicionaron independientemente los cultivos a cuatro tubos conteniendo caldo Man Rogosa Sharpe pH 6,5 suplementado con diferentes concentraciones de bilis: 0,3, 0,5, 1,0 y 2,0 %. Como control se utilizó un tubo con el cultivo de la cepa en Caldo MRS sin adición de bilis de buey, luego fueron incubados a 30 °C. El crecimiento bacteriano fue monitoreado espectrofotométricamente a 560 nm, cada 15 minutos durante 3 horas, según Draksler *et al.*, 2004; Gusils *et al.*, 2002a; Ehrmann *et al.*, 2002; Reque *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 1999.

III.3.6 Tolerancia a valores bajos de pH:

Para determinar la resistencia a condiciones acidificantes, el paquete celular de la bacteria láctica fue lavado 2 veces mediante centrifugación a 3500 rpm con Solución Buffer Fosfato (PBS) pH 7,0, y se resuspendió en tres tubos con PBS ajustado a diferentes valores de pH: 1,0, 2,0 y 3,0 con HCl 1N, como control se inoculó la cepa en PBS a pH 6,5. Los cultivos fueron incubados durante 3 horas a 30 °C, el crecimiento fue monitoreado espectrofotométricamente a 560 nm, cada 30 minutos. Las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} fueron plaqueadas en Agar MRS e incubada a 30 °C por 24 - 48 horas, según Draksler *et al.*, 2004; Gusils *et al.*, 2002a; Ehrmann *et al.*, 2002.

III.3.7 Actividad Proteolítica:

Para evidenciar la característica proteolítica de la cepa en estudio sobre la caseína de la leche, se procedió a sembrar mediante la técnica del moteado de un cultivo activo de la cepa láctica con 24 horas de crecimiento, sobre placas conteniendo Agar leche descremada pH 6,5 y se incubó a 30 °C en condiciones de microaerofilia por 24 a 48 horas. La actividad proteolítica se determinó por la aparición de una halo alrededor de la colonia de *Enterococcus faecium* QPa.1, según Mora *et al.*, 2002.

III.3.8 Prueba de Agregación en Sales:

La característica de hidrofobicidad de la superficie bacteriana de la cepa láctica, fue determinada por el método de Johnson & Wadstrom (1984). Las células de *E. faecium* QPa.1, se obtuvieron mediante centrifugación a partir de un cultivo de 18 horas de crecimiento en caldo MRS pH 6,5. Luego se procedió a lavar 2 veces con PBS 0,02 M, pH 7,0 y fueron resuspendidas en el mismo buffer con una Densidad óptica de 0,5 a 560 nm.

La suspensión de las células bacterianas (25 µl) fueron mezcladas con volúmenes iguales de sulfato de amonio de varias molaridades desde 0,2 hasta 4 mol/L, sobre láminas portaobjetos durante 2 minutos. Se registró como el valor de hidrofobicidad SAT (Salt Aggregation Test), la concentración más baja de sulfato de amonio que permite observar una agregación visible, según Draksler *et al.*, 2004; Gusils *et al.*, 2002a y 2002b; Ljunh & Wadstrom, 1985.

III.3.9 Prueba de Aglutinación:

Las lectinas son mediadores de la unión bacteriana a las células hospederas (Sharon 1936). Esta prueba se hizo en dos etapas:

III.3.9.1 Producción de sustancias tipo lectina:

A partir de un cultivo activo, las células de *Enterococcus faecium* QPa.1 fueron colectadas por centrifugación a 4000 rpm por 20 minutos y suspendidas en 2 mL de Buffer Fosfato Salino pH 6,5. El ensayo de aglutinación fue realizado por triplicado y observado visualmente en láminas portaobjetos, mezclando 10 µl de la suspensión bacteriana a una densidad óptica igual a 0,6 (560 nm), con 5 µl de PBS pH 6,5 y 10 µl de la suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* previamente tratadas (D.O a 560 nm igual a 1,5).

Con el fin de eliminar todo tipo de impurezas, las células de *Sacharomyces cerevisiae* en fase de crecimiento tardía cultivadas en Caldo YPG (Yeast peptone glucose) pH 5,5, fueron lavadas 2 veces con PBS mediante centrifugación a 4000 rpm por 20 minutos en PBS pH 6.5. Al paquete celular, se añadió 2 ml de PBS conteniendo glutaraldehído 1 mg/mL, se incubó durante 1 hora a 25 °C y se lavó 2 veces con PBS, pH 6,5. Posteriormente las células levaduriformes se incubaron por 30 minutos a 25 °C con 2 ml de una solución de glicina 10 mg/mL, luego se lavó como se describió anteriormente, según Draksler *et al.*, 2004; Gusils *et al.*, 2002a.

III.3.9.2 Prueba de inhibición de aglutinación:

La capacidad de 5 azúcares para inhibir la aglutinación, fue probada mezclando una suspensión de 10 µl de *Enterococcus faecium* QPa.1 en PBS pH 6,5 (obtenida según ítem 3.3.9.1), con 5 µl de las soluciones de azúcares. Los carbohidratos glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa y manosa fueron adicionados individualmente a las concentraciones de 0,2 y 1 M, luego se agregó 10 µl de la suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* previamente tratadas (Ver ítem III.3.9.1).

Para la observación visual y microscópica en láminas portaobjetos, se adicionó 5 µl de safranina al 30%, para visualizar mejor la adherencia de las células bacterianas a la superficie celular de la levadura, según Mirelman *et al.*, 1980; Gusils *et al.*, 2002a.

IV. RESULTADOS

IV.1 Resistencia a antibióticos

La cepa ensayada de *Enterococcus faecium* QPa.1, resultó resistente a los antibióticos: ampicilina, oxacilina, penicilina y eritromicina, asimismo se comprobó su alta sensibilidad frente a la mayoría de los antibióticos como cloramfenicol, bacitracina, tetraciclina, rifampicina, estreptomicina, vancomicina, kanamicina, lincomicina y cefoxitina (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de sensibilidad a los antibióticos de *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a 13 antimicrobianos.

Antibióticos	Concentración (µg)	QPa.1(P)
Ampicilina	10	R
Bacitracina	10	S
Cefoxitina	30	S
Cloramfenicol	30	S
Eritromicina	15	R
Estreptomicina	10	S
Kanamicina	30	S
Lincomicina	20	S
Oxacilina	1	R
Penicilina	10 UI	R
Rifampicina	5	S
Tetraciclina	30	S
Vancomicina	30	S

R: resistente, S: sensible.

IV.2 Actividad hemolítica

La cepa *Enterococcus faecium* QPa.1 no produjo hemólisis en Agar nutritivo suplementado con sangre de carnero al 5% (Figura 1).

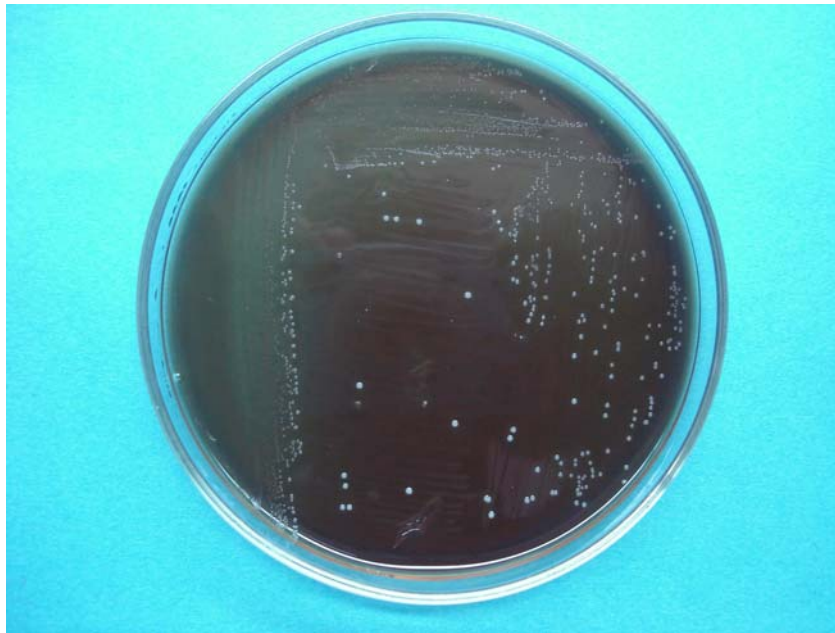


Figura 1. Ausencia de la actividad hemolítica en *Enterococcus faecium* QPa.1

IV.3 Actividad inhibitoria

Enterococcus faecium QPa.1 mostró una buena actividad inhibitoria frente a la cepa sensible de la misma especie, *Enterococcus faecium* QPe.1 (Figura 2).

Además se pudo comprobar un mínimo efecto inhibitorio contra la mayoría de bacterias patógenas ensayadas. Sin embargo tuvo una muy buena actividad antimicrobiana solo frente a *Listeria monocytogenes* (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto inhibitorio de *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a bacterias patógenas

Cepa probiótica	Diámetro de la zona de inhibición (mm) contra cepas sensibles				
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcus faecium</i> QPa.1	2	2	2	17	3



Figura 2. Halos de inhibición de *Enterococcus faecium* QPa.1, frente a *Enterococcus faecium* QPe.1

Por otro lado el sobrenadante libre de células, obtenido a partir de un cultivo activo de *E.faecium* QPa.1, mantuvo su actividad inhibitoria aún después de someterlo a diferentes valores de pH 3,0, 6,5 y 8,0 (Figura 3).



Figura 3. Efecto inhibitorio de *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a *Listeria monocytogenes*

Sob: Sobrenadante crudo
Sob.F: Sobrenadante filtrado
Sob.N: Sobrenadante filtrado neutralizado a pH 6,5
Sob.pH 3: Sobrenadante filtrado neutralizado ajustado a pH 3,0
Sob.pH 8: Sobrenadante filtrado neutralizado ajustado a pH 8,0

IV.4 Tolerancia a bilis de buey

Los resultados evidenciaron que la cepa *Enterococcus faecium* QPa.1 fue capaz de tolerar concentraciones crecientes desde 0,3 hasta 2% de bilis de buey (Oxgall) (Figura 4).

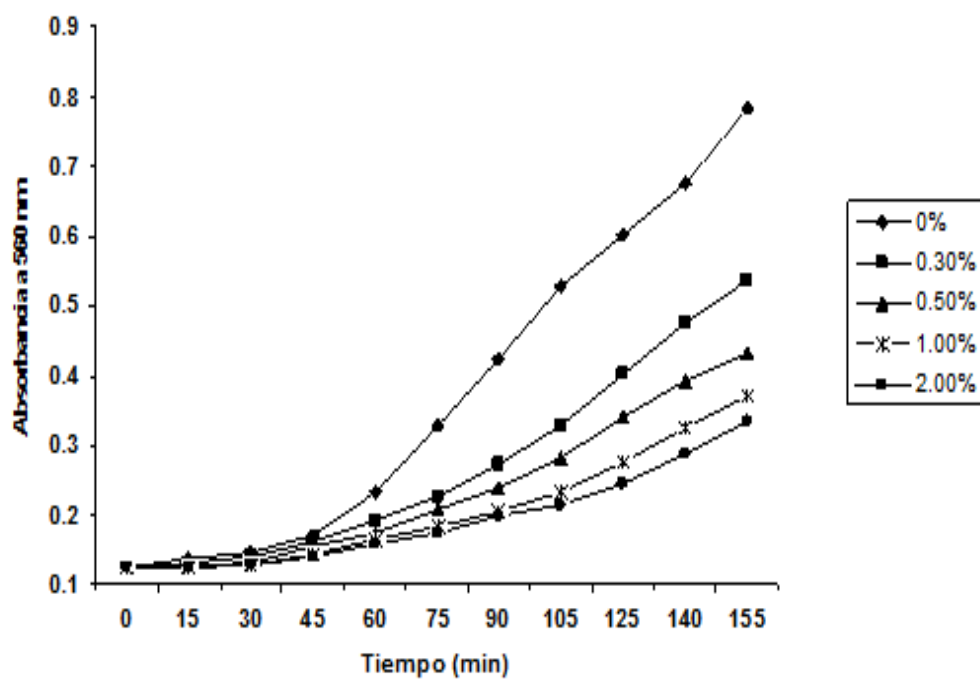


Figura 4. Crecimiento de *Enterococcus faecium* QPa.1 en caldo MRS con diferentes concentraciones de sales biliares.

IV.5 Resistencia a pH ácidos

Enterococcus faecium QPa.1 se mantuvo viable desde pH 6,5 hasta pH 2,0 durante un periodo de incubación de 3 horas, lo que indica una buena tolerancia (Figura 5)

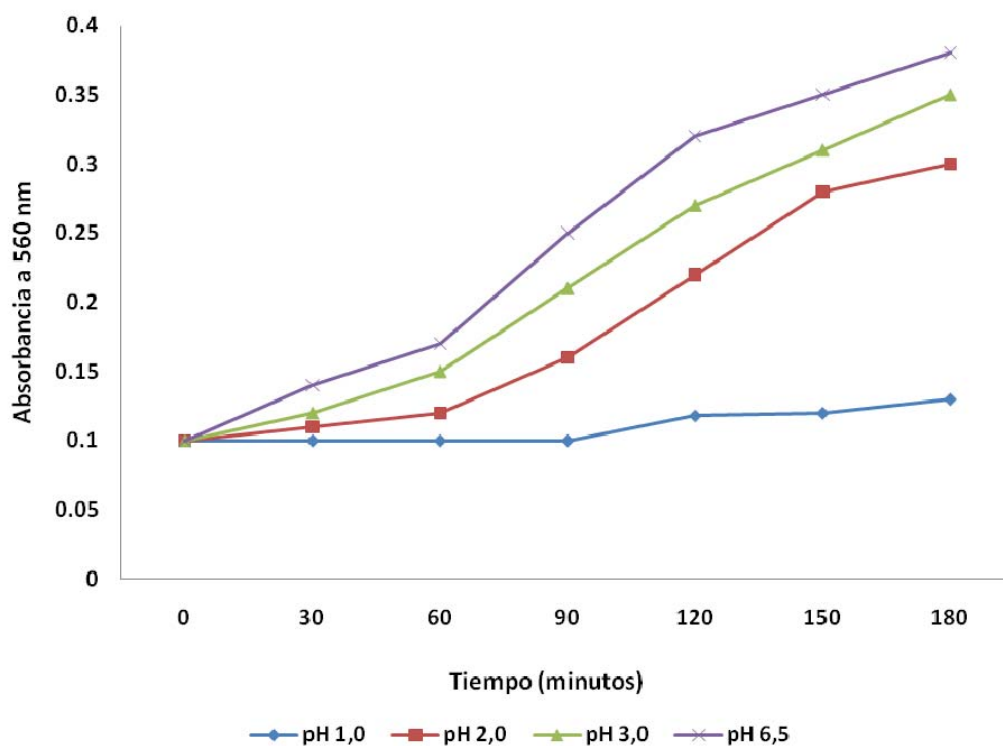


Figura 5. Tolerancia a diferentes valores de pH bajos de *Enterococcus faecium* QPa.1

IV.6 Actividad proteolítica

La cepa de *Enterococcus faecium* QPa.1 presentó una actividad proteolítica con un diámetro promedio de 17 mm, similar a las cepas patrones de *Lactobacillus plantarum* E2 y M4 (Figura 6).

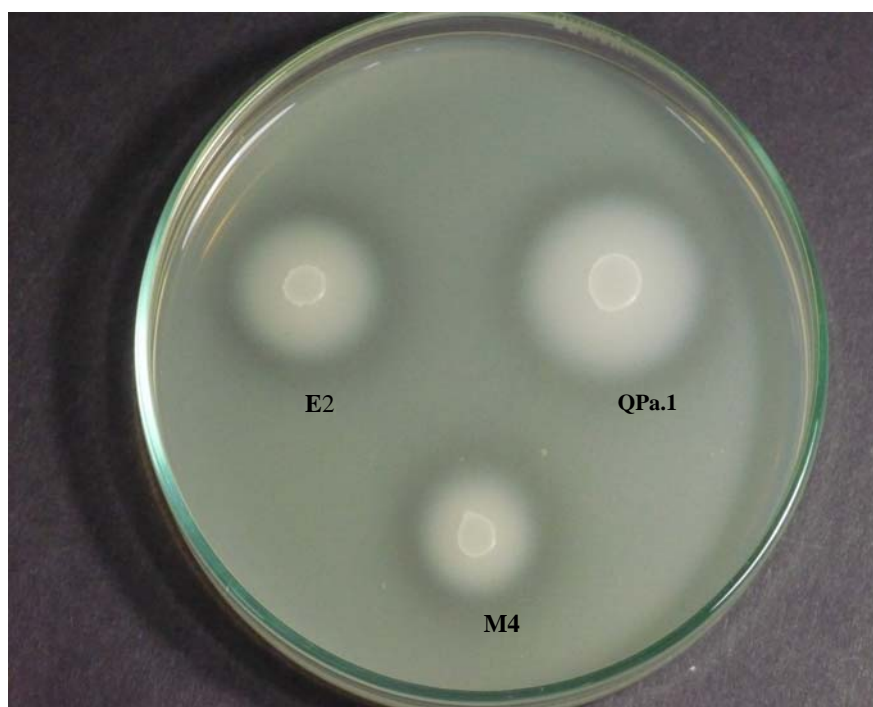


Figura 6. Actividad proteolítica de las bacterias lácticas asociadas a Chicha de jora y Queso de elaboración artesanal

E2: *Lactobacillus plantarum* aislado de “chicha de jora”

M4: *Lactobacillus plantarum* aislada de “masato”

QPa.1: *Enterococcus faecium* aislada de queso artesanal

IV.7 Prueba de agregación en sales

Este método permitió medir la capacidad de adhesión bacteriana a ciertos sustratos hidrofóbicos. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa ensayada mostró un precipitado y una turbidez constante visible a 0,2 M de sulfato de amonio. La hidrofobicidad de la superficie celular está inversamente correlacionada con el valor del SAT (Salt aggregation test), (Tabla 3).

IV.8 Prueba de aglutinación

Se ha observado una aglutinación positiva al mezclar las suspensiones de *Enterococcus faecium* QPa.1 con las células de las levaduras tratadas (Figura 7). Para complementar esta prueba se mezcló 10 µl de la suspensión bacteria - levadura con 5 µl de safranina, y se observó al microscopio a 100X de aumento. La aglutinación fue inhibida sólo con la adición de manosa 0,2 M (Tabla 3).

Tabla 3. Propiedades de adhesión de *Enterococcus faecium* QPa.1 frente a *Saccharomyces cerevisiae*

Propiedades de adhesión	Cepa
	<i>Enterococcus faecium</i> QPa.1
Agregación ^a	0,2
Aglutinación ^b	+
Aglutinación con adición de soluciones de carbohidratos	
Glucosa	+
Galactosa	+
Lactosa	+
Sacarosa	+
Manosa	-

^a La concentración más baja de sulfato de amonio que da una agregación visible

^b Aglutinación con levaduras tratadas

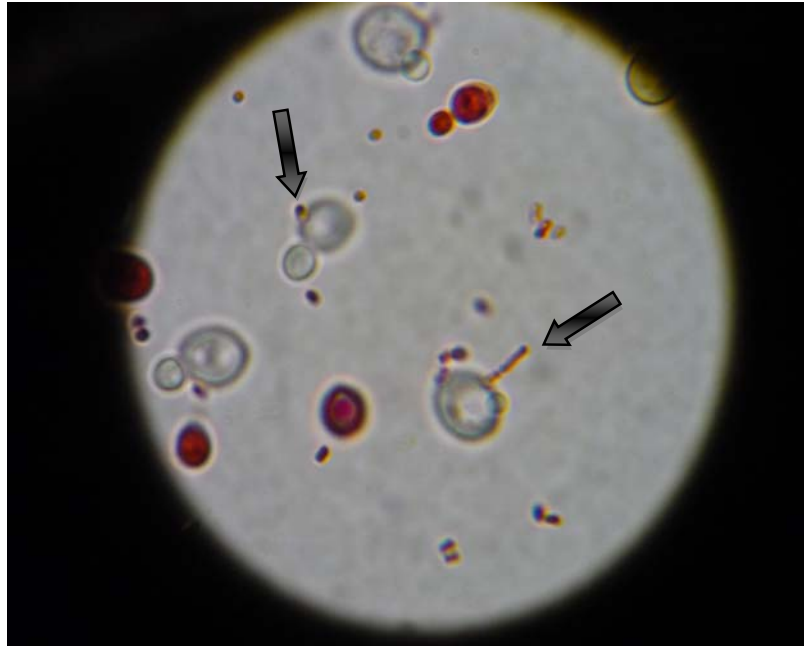


Figura 7. Vista microscópica de la adherencia de *Enterococcus faecium* QPa.1 a la superficie celular de *Saccharomyces cerevisiae* (flechas) 100X.

V. DISCUSIÓN

La cepa de *Enterococcus faecium* QPa.1 utilizada en el presente estudio, fue susceptible a la mayoría de inhibidores de pared celular, inhibidores de síntesis de proteínas, inhibidores de síntesis de ácidos nucleicos. Estos resultados coincidieron con los estudios de Belicová *et al.*, 2007, en cepas de enterococos aislados de quesos eslovacos con alta sensibilidad a la vancomicina.

Asimismo sólo fue resistente a ampicilina, penicilina, oxacilina y eritromicina. Similares resultados obtuvieron Bulajic & Mijacevic, 2004, quienes demostraron que 42 cepas de enterococos aislados de quesos serbios fueron resistentes a la ampicilina y eritromicina.

Con respecto al espectro antimicrobiano hemos comprobado que la cepa de *Enterococcus faecium* QPa.1 mostró una actividad antibacteriana muy importante solo frente a *Listeria monocytogenes*. Estos resultados coinciden con Franz *et al.*, 2003; asimismo Estepar *et al.*, 1999, encontraron que la cepa de *Enterococcus faecium* aislado de queso francés producía la enterocina A, de reducido espectro inhibitorio, con un modo de acción bactericida y de mayor especificidad contra *Listeria monocytogenes*. Esto sugiere que la enterocina A, podría ser ampliamente distribuida para controlar el crecimiento de cepas de *Listeria* en alimentos fermentados.

Para que un microorganismo pueda adherirse y desenvolverse en el epitelio intestinal y para ser considerado como probiótico es preciso que sobreviva a todas las barreras del tracto gastrointestinal (Marteu *et al.*, 2001). *Enterococcus faecium* QPa.1 sobrevivió a rango de pH comprendido entre pH 2,0 y 3,0, durante un periodo de incubación de 2 a 3 horas, similar resultado fue reportado por El-Naggar, 2004, demostró una alta tolerancia pH ácidos.

En cuanto a la actividad β hemolítica, la cepa evaluada no exhibió dicha característica, cuando creció en Agar nutritivo suplementado con sangre de carnero. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Suzzi *et al.*, 2000, quienes demostraron que las cepas de *Enterococcus faecium* aislados de quesos caprinos no produjeron hemolisinas, siendo una propiedad importante ya que su presencia esta relacionada con factores de virulencia.

En el ensayo realizado puso en manifiesto que *E.faecium* QPa.1 tiene una buena actividad proteolítica. El efecto de la actividad proteolítica es considerado como una característica de importancia tecnológica, ya que contribuye con el desarrollo del aroma, sabor y textura del queso (Suzzi *et al.*, 2000).

Según Dunne *et al.*, 2001 para que una bacteria presente características potencialmente probióticas debe ser capaz de sobrevivir a concentraciones de 0,5 % de bilis de buey. Nuestros resultados evidenciaron que *E.faecium* QPa.1, es tolerante a bilis de buey entre 0,5 y 2,0 %. La resistencia a la bilis de algunas cepas está relacionada a la actividad específica de la enzima hidrolaza sales biliares, el cual ayuda a hidrolizar el conjugado de bilis, reduciendo su efecto tóxico (Kacem & Karam, 2006).

El primer paso en la colonización de un ambiente, es la adherencia bacteriana que es el resultado de mecanismos específicos (ligando-receptor, polisacáridos exocelulares, proteínas y/o ácido lipoteicoico) e inespecíficos. Los mecanismos no específicos de unión involucran fuerzas electrostáticas o interacciones hidrofóbicas de baja afinidad que interactúan en la unión específica.

La habilidad de agregación de la cepa *Enterococcus faecium* QPa.1, fue registrada como positiva en la prueba de agregación en sales (SAT), después de su exposición a una concentración de sulfato de amonio 0,2 M, confirmando su característica hidrofóbica. La importancia del carácter hidrofóbico de una cepa como factor de selección reside en que permitiría la fijación de las bacterias probióticas a las placas de peyer y su posterior traslocación al interior de las células epiteliales, donde estimularían al sistema inmune (Reinheimer & Zalazar, 2006).

Las estructuras tipo lectina son factores que promueven la capacidad de aglutinar células y formar precipitados o glicoconjugados en una manera similar a las interacciones antígeno-anticuerpo (Annuk *et al.*, 2001), esta característica fue evidenciada en nuestros resultados sugiriendo que existen propiedades asociativas tipo lectina en la superficie celular bacteriana de *Enterococcus faecium* QPa.1. Además la adhesión fue inhibida sólo por la adición del carbohidrato manosa 0,2 M este resultado indica que esta estructura tipo lectina tiene a la manosa como azúcar específico de unión a las levaduras. Nuestros resultados coincidieron con los hallazgos de Gusils *et al.*, (2002a) y Draksler *et al.*, (2004).

La expresión de adhesinas bacterianas tipo lectina, promueven la unión a células epiteliales del intestino o mucinas, de manera que actúan como un factor promotor de la colonización y persistencia en el intestino (Adlerbert *et al.*, 1996).

VI. CONCLUSIONES

- La cepa de *Enterococcus faecium* QPa.1 aislada de queso artesanal sobrevive a valores de pH ácidos de 2 a 3 y tiene la capacidad de crecer en presencia de 0,3 y 2 % de concentración de bilis de buey.
- *Enterococcus faecium* QPa.1, no produce hemolisinas y es sensible a la bacitracina, cefoxitina, cloramfenicol, estreptomicina, kanamicina, lincomicina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina.
- *Enterococcus faecium* QPa.1 tiene una buena actividad inhibitoria específica solo contra *Listeria monocytogenes*, bacteria de alto riesgo patológico para la salud humana.
- La cepa nativa de *Enterococcus faecium* QPa.1 presenta capacidad proteolítica muy significativa, característica de interés tecnológico en bacterias lácticas.
- *Enterococcus faecium* QPa.1 aislado por primera vez de quesos artesanales de origen peruano, puede ser utilizado como probiótico o como cultivo adjunto y/o bioprotector en la elaboración de quesos regionales.

VII. RECOMENDACIONES

- Para complementar estos estudios, es necesario realizar las pruebas de adherencia a líneas celulares humanas y la los ensayos *in vivo*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adlerbert, I., Ahrné, S., Johanson, M.L., Molin, G., Hanson, L.A. and Wold, A.E (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (7): 2244-2251.

Annuk, H., Hynes, S.O., Hirno, S., Mikelsaar, M. and Wadstrom, T (2001). Characterization and differentiation of lactobacilli by lectin typing. *J.Med. Microbiol.* 50: 1069 - 1074.

Belicová, A., Krizková, L., Krajcovic, J., Jurkovic, D., Sojka, M., Ebringer, L. and Dusinsky, R (2007). Antimicrobial Susceptibility of Enterococcus species Isolated from Slovak Bryndza Cheese. *Folia Microbiol.* 52(2): 115-119.

Borrielo, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M. and Valtonen, V (2003). Safety of probiotics that contains lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Disease* 36: 775-780

Brizuela, M.A., Serrano, P and Pérez, Y (2001). Studies on Probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. *Brazilian archives of Biology and Technology* 44 (1): 95-99.

Bulajic, S. and Mijacevic, Z (2004) Enterococci in chesse – phenotypization and antibiotic resistance. *Act. Agriculture slovenica* 84(1): 25 - 30.

Centeno, J.A., Menéndez, S. and Rodríguez-Otero, J.L (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese Northwest Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 307-313.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.* 51(4): 123-136, 1998.

Chou, L. and Weimer, B (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolated from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82 :23-31.

Comisión Europea (2004). List of the authorized additives in feedingstuffs published in application of Article 9t b of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Union*, 25.2.2004, C50.

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G and Sorrentino, E (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from parmigiano regiano chesse. *Lait* 85: 193-204

Draksler, D., Gonzáles, S. and Oliver, G (2004). Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 397-405.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'halloran, S., O'Sullivan, G.C. Shanahan, F. and Collins, K (2001). In vitro selection criteria for probiotic acteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutri.* 73(2): 386-392.

Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J and Vogel R.F (2002). Characterization of lactobacilli toward their use as probiotic adjunts in poultry. *Journal of Applied Microbiology* 92: 966-975.

El-Naggar, M. Y. M (2004). Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology* 3 (2): 173-180.

Estepar J, Del Mar Sánchez M, Alonso L and Mayo B (1999). Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Intl Dairy Journal* 9: 737-746.

FAO/OMS (2001). Informe de la consulta de expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Córdoba, Argentina, 1 al 4 de octubre de 2001, pág 1-29.

Ferrer, L.B. y Dalmau, S.J (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Act. Pediatric. Esp.* (59): 150-155.

Fleet, G. H (1999) Microorganisms in food ecosystems. *International Journal Food Microbiology* 50 : 101-117.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106:1 - 24.

Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. and Holzappel, W.H(2003).Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88:105-122.

Fuller, R (1989). Probiotics in man and animals. *J. appl. Bacteriol.* 66: 365 - 378.

Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P., Collins, J., Fitzgerald and Ross, R (1999). Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. *J.Dairy Sci* 82: 1379-1387.

Gibson, G. R. and Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Supplement of The Journal of Nutrition* 391S-395S.

Gilliland, S. E. (1998). Fermented milks and probiotics. Ed. Marth, E. H.; Steele, J. L. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Estados Unidos, *Applied Dairy Microbiology*, Cap. 8: 195-212.

Guarner, F. and Schaafsma, G.J (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39:237-238.

Gusils, C., Bujazha M and González, S (2002a). Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia* 27 (8): 409-413.

Gusils, C., Cuozzo, F. and González, S (2002b) Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Can. J. Microbiol.* 48: 34 – 42.

Haberer, P., du Toit, M., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W. H. (1996). Practical criteria for selection and judgement of lactic acid bacteria as probiotics. *IDF Nutrition Newsletter*, 5, 36.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J (1992). *Probiotics: A general view. The lactic acid bacteria in health & disease.* Ed. Wood, B. J. B. Chapman & Hall. Elsevier Applied Science, Reino Unido:151-70.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J (1998).

Overview of gut flora and probiotics. *Int. Dairy J.* 41: 85-101.

Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.I. and Monfort, J.M (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J Appl Bacteriol.* 79: 322-330.

Jonsson, P., and Wadstrom, T (1984). Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT). *Curr. Microbiol.* 10: 203-210.

Kacem, M. and Karam, N. E (2006). In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and prebioics.* 1 (1): 27-72.

Laukova, A., Marciňakova, M. Strompfova, V. and Ouwehand, A. C (2008). Probiotic potencial of Enterococci isolated from canine feed. *Folia Mibrobiol.* 53 (1): 84-88.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, L., Rizzello, C. G. and Visconti, A (2005). Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (8): 4233-4240.

Lázaro, D., Carcelén, C., Torres, A., Marlon, T. y Ara, M (2005). Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16(2): 97-102.

Leahy, S., Higgins, D., Fitzgerald, G. and Sinderen, D (2005). Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98:1303-1315.

Lee,Y.K., Nomoto, K., Salminen, S. and Gorbach, S.L (1999) *Handbook of probiotics*. New York: John Wiley & Sons, Inc.,USA. Cap. 1: Introduction: 1-22

Ljungh, A., Hjerten, S and Wadstrom, T (1985). High surface hydrofobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infection and Immunity* 47 (2): 522-526.

López-Brea, M. y Domingo, D (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Rev. Quím. Quimioterap.* 20 (2): 170-181.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16 (3):189-199.

Marciňáková, M., Simonová, M. and Lauková, A (2004). Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. *Acta Vet. BRNO.* 73: 513 - 519.

Marteau, P., De Vrese, M., Cellier, C.J. and Schrezenmeir, J (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American. Journal. Clinical. Nutrition.* 73 (suppl) 430S-6S.

Mejía, J.A., Chacón, Z., Guerrero, B., Otoniel, J y López, G (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in vitro como Potenciales Probióticos. *Revista Científica, FCV-LUZ.* XVII (2):178-185.

Medel, P., Gracia, M.I, Espinel, A., Martín, O.S., García, E. y Bremmers, R (2007). Conociendo los probióticos: uso en monogástricos. Norel Nature Nutrición S.A Madrid España. 135 pp.

Mirelman, D., Altmann, G. and Eshdat, Y (1980). Screening bacterial isolated for mannose-specific activity by agglutination of yeast. *Journal of clinical microbiology* 11(4): 328-331.

Mora, D., Fortina, M.G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G and Mananchini, P.L (2002). Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 278-287

Nes, I.F., Diep, B.S. and Haverstein, L.S (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 113-128

Ogier, J.C. and Serror, P (2007). Safety assessment of dairy microorganisms: *Enterococcus* genus. *Int J Foods Microbiol.* 123(3): 291-301.

Ouwehand, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289.

Quillama, E (1998). Producción de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora. Tesis para optar al grado académico de Magíster en Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.N.M.S.M.

Reinheimer, J y Zalazar, C (2006). Avances en microbiología, bioquímica y tecnología del queso. Ed. UNL, Santa fé- Argentina, 1 ed, cap. 3:59-71.

Reque, E. , Pandey, A., Franco, S. G. and Soccol, C. R (2000). Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotics in chickens. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 303-307.

Rodriguez, A.V, Gaya, P., Nuñez, M. and Medina, M (1998). Inhibitory activity of nisin-producing starter cultura on *Listeria innocua* in raw ewes milk manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 129-132

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y.K (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology* 10: 107-110.

Sanders, M.E. and Huis in't Veld, J.H (1999). "Bringing a probiotic - containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues" en *Antoine van Leeuwenhoek* 76: 293-315.

Sanders, M. E (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Supplement of The Journal of Nutrition*, 384S-390S

Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 1-19.

Schrezenmeir, J. and de Vrese, M (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Supplement of American Journal of Clinical Nutrition* 73: 361S-364S.

Sedano, J.L (2006). Selección de cepas nativas de *Lactobacillus* con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol aisladas de "Masato". Tesis Grado Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. U.N.M.S.M.

Sharon, N. and Liz, H (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53R – 62R

Sneath, P.H.A, Mair, N.S, Sharpe, H.E and Holt, J.E (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed.Williams and Wilkins Co, Baltimore, Vol 2.

Stanton, C., Desmond, C., Fitzgerald, G. and Ross, R.P (2003). Probiotic health benefits – reality or myth? *Aust. J. Dairy Technol.* 58: 107-113.

Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C. and Lanorte, M.T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat't cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* 89: 267 – 274.

Tagg, J.R and McGiven, A.R (1971). Assay system for bacteriocins. *Appl.Microbiol.* 21, 943.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81:1-10.

Vinderola, C., and Reinheimer, J (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, 271-275.

Vizoso Pinto, M. G., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H (2006). *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109 (3), 205-214.

Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N (2000).

Characterization of *Lactobacillus* isolated from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology* 17: 205-215.

Ziemer, C. J. and Gibson, G. R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and

synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies.

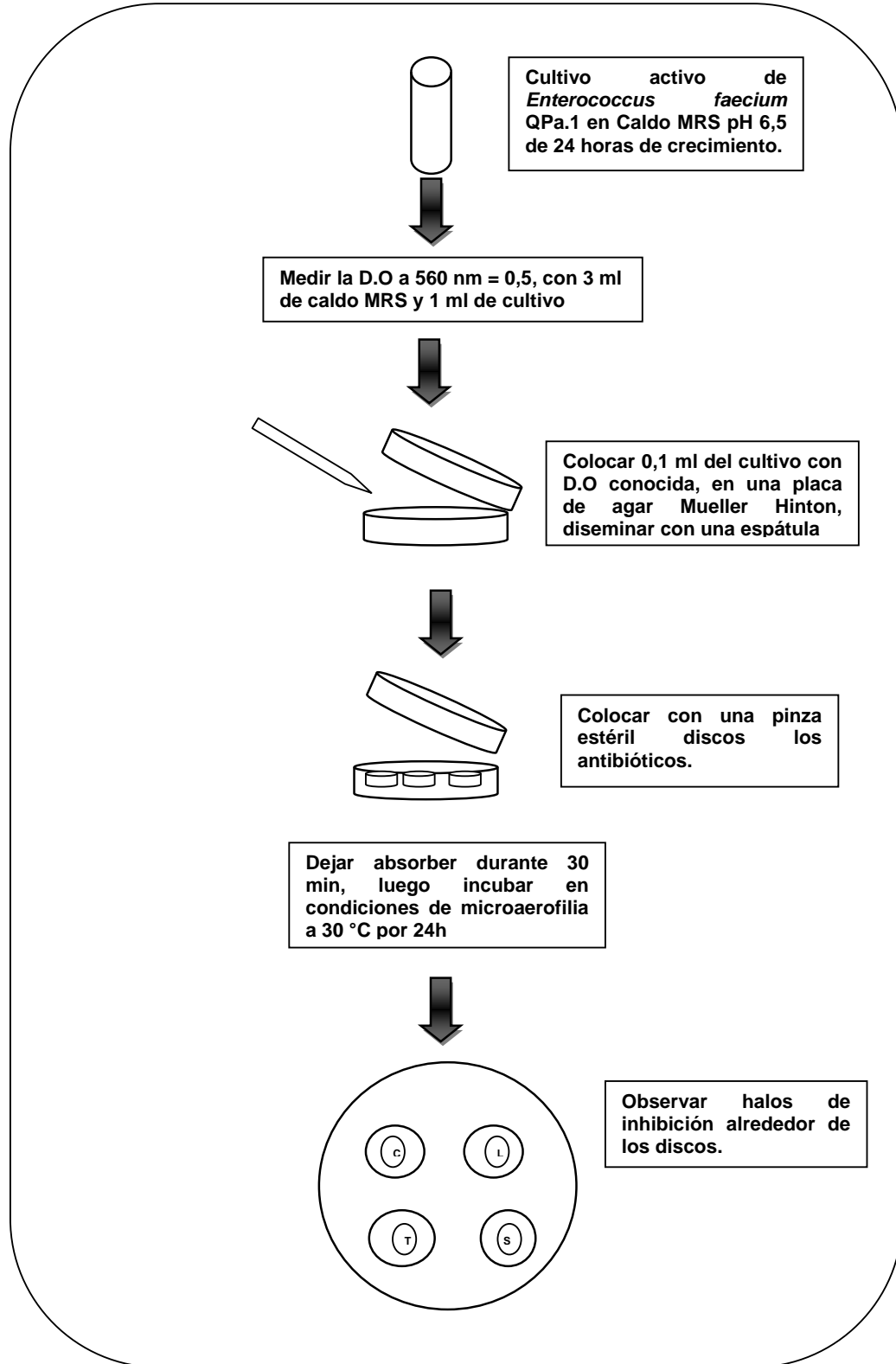
International Dairy Journal 8: 473-479

Zuñiga, M., Pardo, I. and Ferrer, S (1993). An improved medium for distinguishing

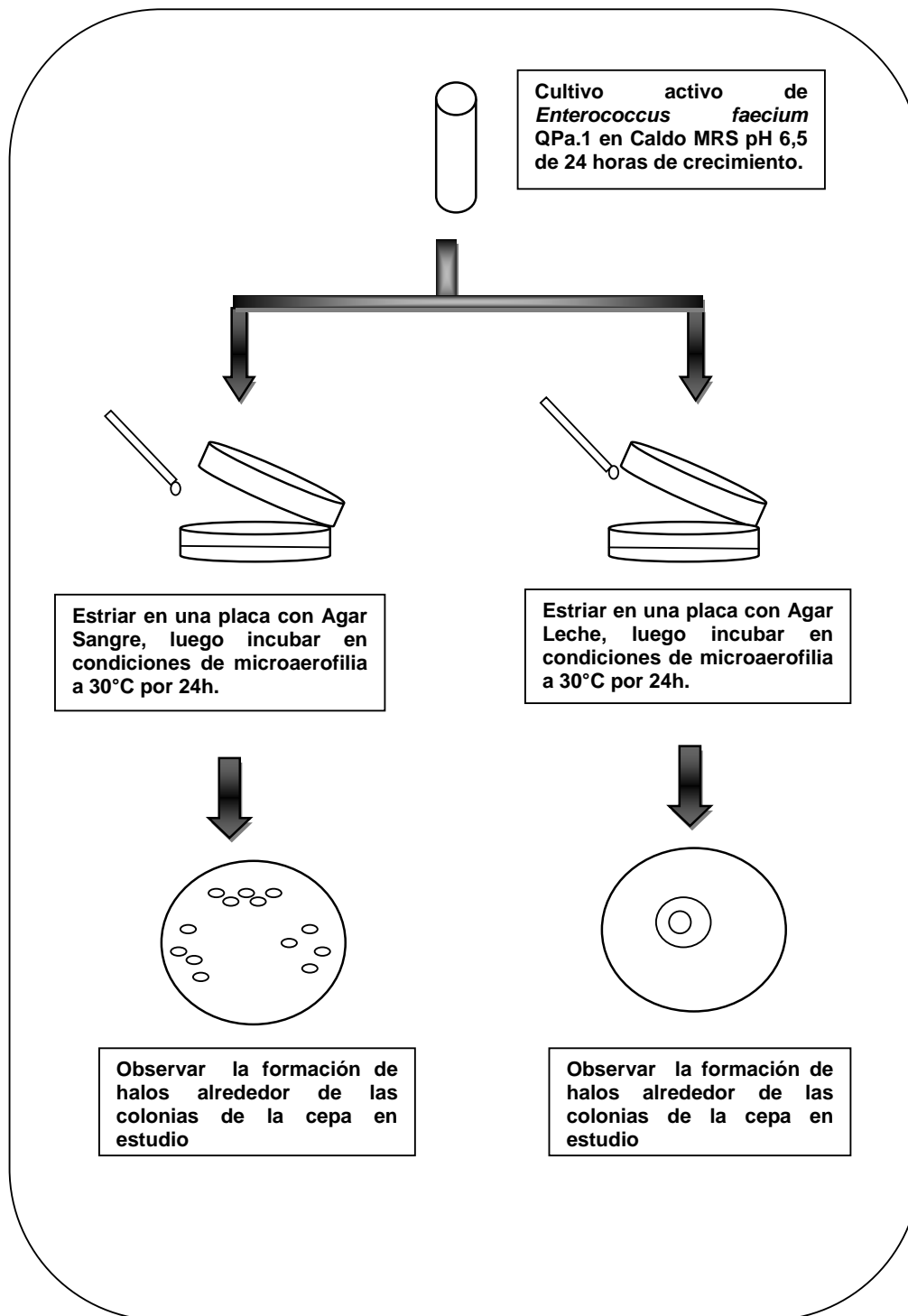
between homofermentative lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 18:37-42

IX. ANEXO

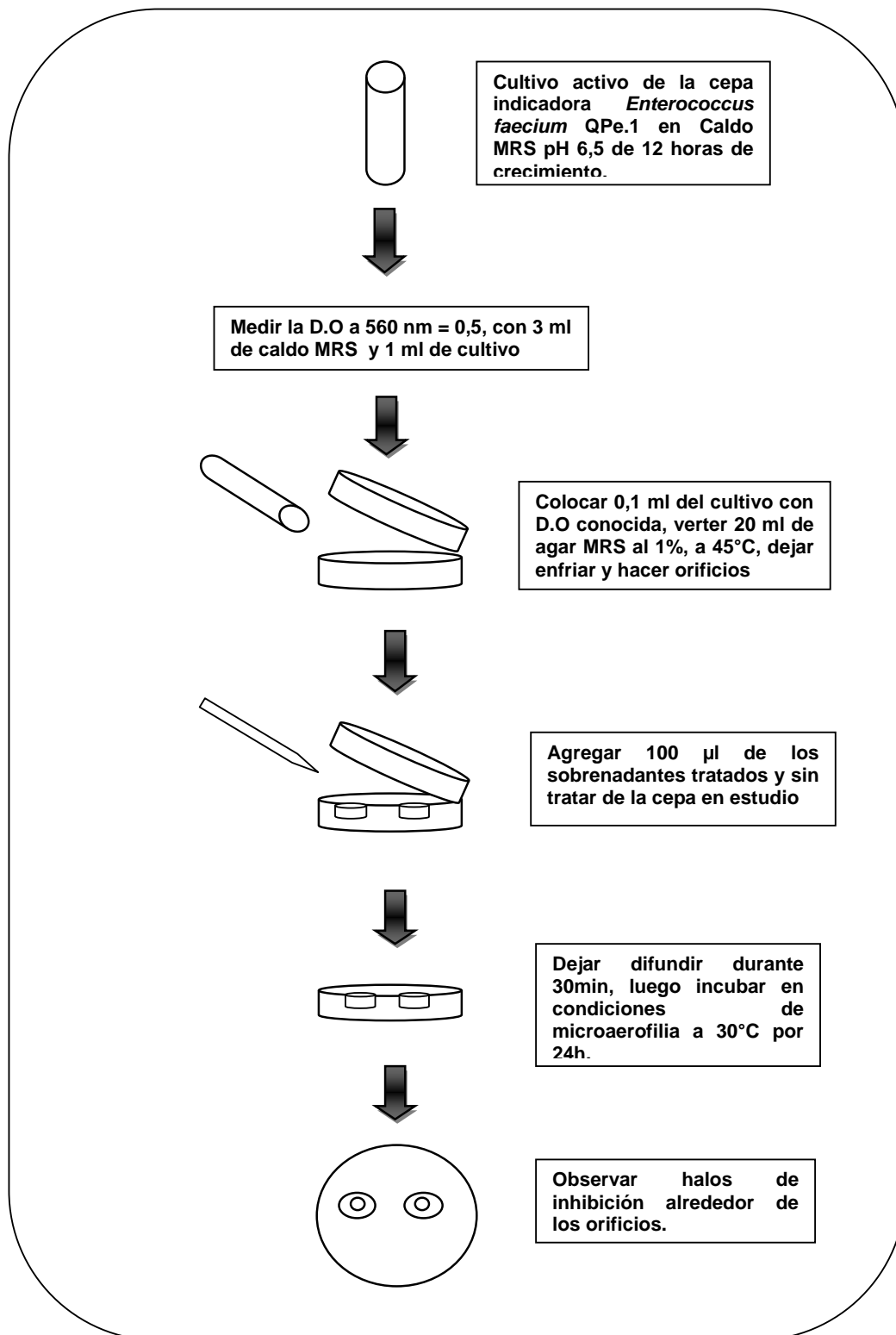
PROTOCOLO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS



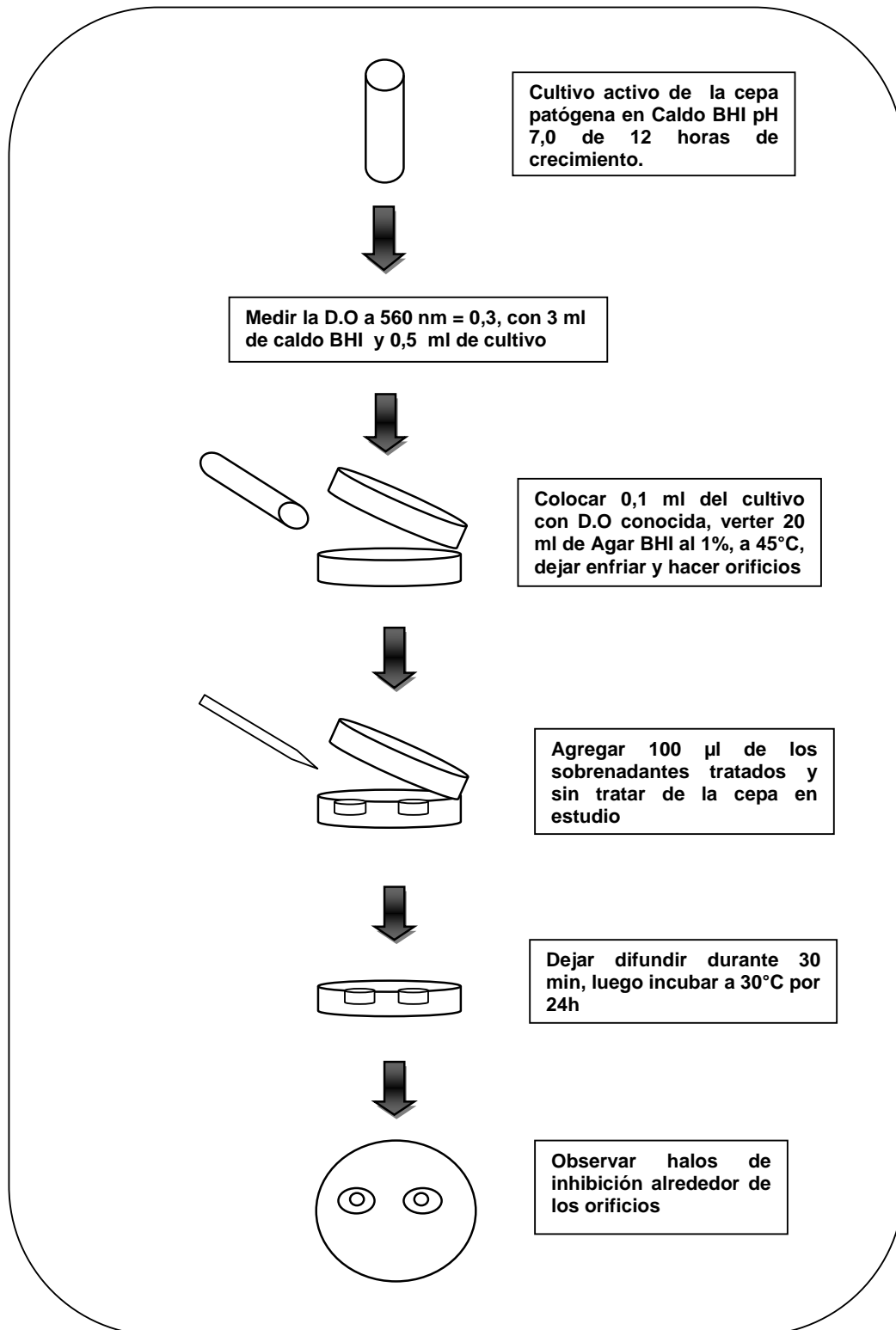
PROTOCOLO DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y PROTEOLÍTICA



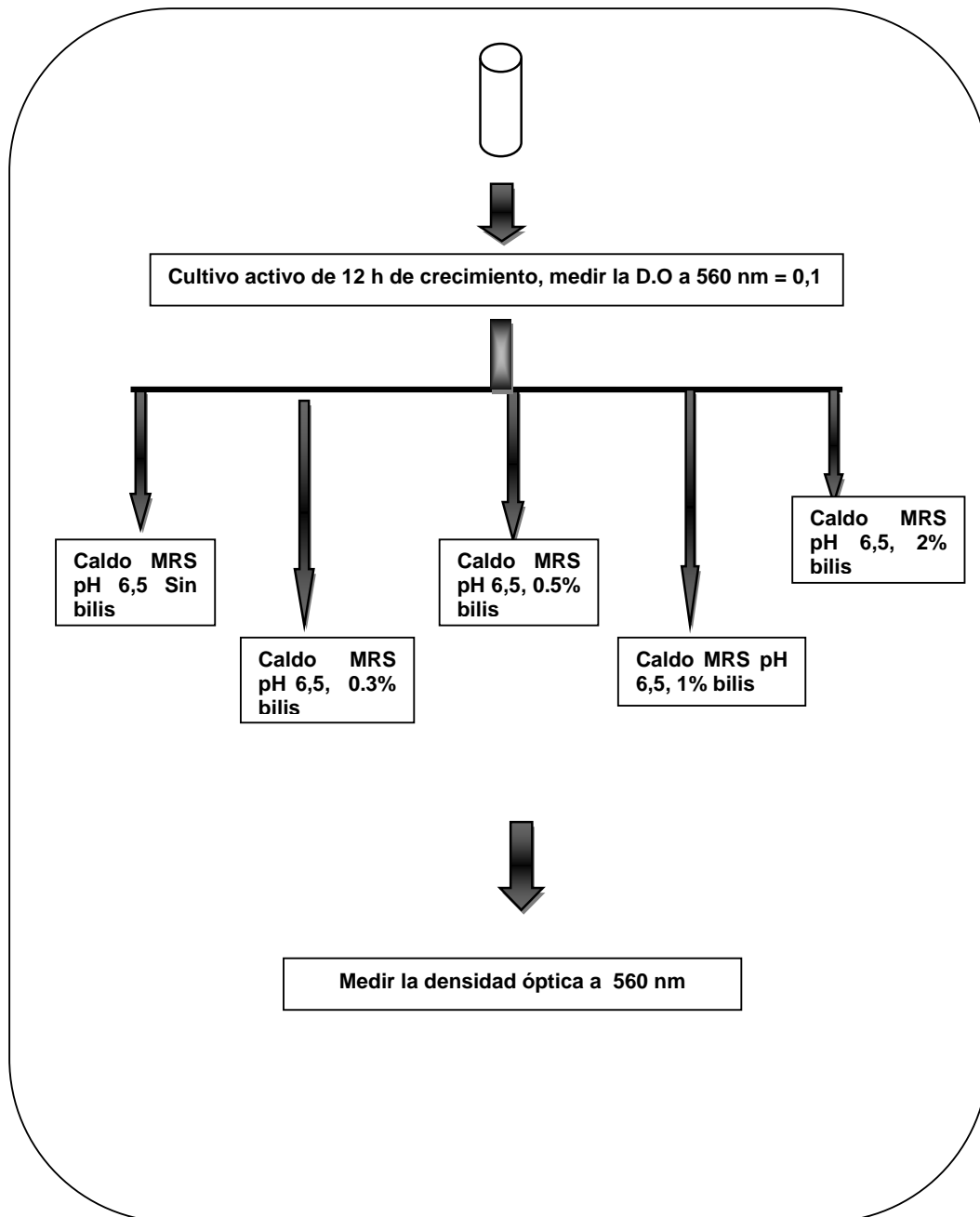
PROTOCOLO PARA DETECTAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS



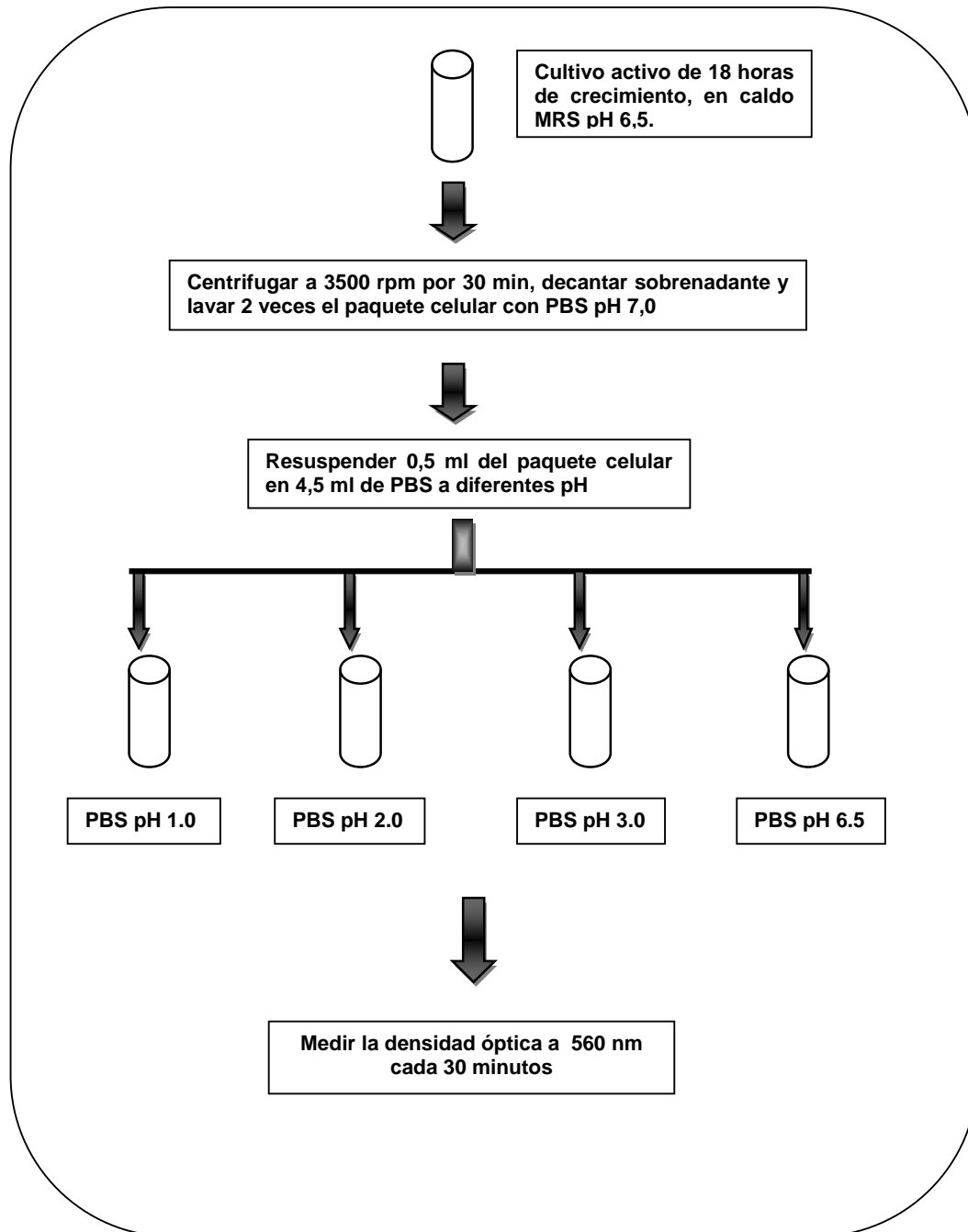
**PROTOCOLO PARA DETECTAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE
BACTERIAS PATÓGENAS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS**



PROTOCOLO DE TOLERANCIA A BILIS DE BUEY



PROTOCOLO DE TOLERANCIA A pH ÁCIDOS



MEDIOS DE CULTIVO

1. AGAR LECHE

Peptona de carne _____ 5,0 g/L

Extracto de levadura _____ 3,0 g/L

Leche descremada _____ 20,0 ml/L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

2. CALDO MAN ROGOSA SHARPE (MRS)

Peptona de caseína _____ 10,0 g/L

Extracto de carne _____ 10,0 g/L

Extracto de levadura _____ 5,0 g/L

Glucosa _____ 20,0 g/L

K₂HPO₄ _____ 5,0 g/L

Citrato diamónico _____ 2,0 g/L

Acetato de sodio _____ 5,0 g/L

MgSO₄·7H₂O _____ 0,5 g/L

MnSO₄·7H₂O _____ 0,2 g/L

Tween 80 _____ 1,0 mL/L

Agar _____ 20,0 g/L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

3. CALDO NUTRITIVO

Peptona de carne	_____	10,0 g/L
Extracto de carne	_____	3,5 g/L
NaCl	_____	5,0 g/L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

4. AGAR SANGRE

Peptona de carne	_____	5,0 g/L
Extracto de carne	_____	3,0 g/L
NaCl	_____	6,0 g/L
Agar	_____	15,0 g/L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

Adicionar sangre de carnero al 5%.

5. CALDO YEAST PEPTONE GLUCOSE (YPG)

Extracto de levadura	_____	5,0 g/L
Peptona de carne	_____	10,0 g/L
Glucosa	_____	20,0 g/L
Agar	_____	18,0 g/L

Ajustar a pH 5,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

6. AGAR MULLER HINTON

Extracto de levadura _____ 300,00 g/L

Hidrolizado de caseína _____ 17,50 g/L

Almidón _____ 1,50 g/L

Agar _____ 17,0 g/L

Ajustar a pH 7,3, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

7. CALDO BHI

Extracto de cerebro _____ 12,5 g/L

Extracto de corazón _____ 5,0 g/L

Proteosa-peptona _____ 5,0 g/L

Dextrosa _____ 2,0 g/L

Cloruro sódico _____ 5,0 g/L

Fosfato disódico _____ 2,5 g/L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

SOLUCIONES BUFFER

1. BUFFER FOSFATO SALINO 0,02 M

NaCl _____ 1,16 g/L

KH₂PO₄ _____ 2,72 g/L

K₂HPO₄ _____ 3,48 g/L

Agua destilada _____ 1 L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

2. BUFFER FOSFATO SALINO

NaCl _____ 8,0 g/L

KCl _____ 0,2 g/L

KH₂PO₄ _____ 2,72 g/L

K₂HPO₄ _____ 3,48 g/L

Disolver en 80 ml de agua bidestilada, trasvasar a una fiola de 100 ml y completar el volumen a 100 ml. Disolver 1/10, ajustar el pH a 6,5 con NaOH y HCl 0,1 N y esterilizar por 15 minutos a 121°C.

COLORANTES

1. CRISTAL VIOLETA

Solución A:	Cristal violeta	_____	2,0 gr.
	Alcohol etílico (95°C)	_____	20,0 ml
Solución B:	Oxalato de amonio	_____	0,8 gr.
	Agua destilada	_____	100,0 ml

Mezclar Solución A y B luego filtrar.

2. LUGOL

Yodo metálico	_____	1gr.
Yoduro de Potasio	_____	2 gr.
Agua destilada	_____	200 ml

Disolver el yoduro en pequeña cantidad de agua, agregar y disolver, luego añadir el resto del agua destilada

3. ALCOHOL ACETONA

Etanol 70%	_____	70 ml
Acetona	_____	30 ml

4. SAFRANINA

Safranina	_____	2,5 gr.
Alcohol 95%	_____	100,0 ml

Agregar 10 ml a 100,0 ml de agua destilada.